

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/73430 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10,
D-13125 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01809

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Mai 2000 (29.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 24 405.7 27. Mai 1999 (27.05.1999) DE
199 43 016.0 9. September 1999 (09.09.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GOLETZ, Stefan [DE/DE]; Triftstrasse 15b, D-13129 Berlin (DE).
KARSTEN, Uwe [DE/DE]; Oderbruchstrasse 29, D-10407 Berlin (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VACCINES AGAINST CONFORMATION-DEPENDENT ANTIGENS AND AGAINST ANTIGENS THAT ARE NOT OR ARE NOT ONLY PROTEINS OR PEPTIDES

(54) Bezeichnung: VAKZINE GEGEN KONFORMATIONSSABHÄNGIGE ANTIGENE SOWIE GEGEN ANTIGENE, DIE KEINE ODER NICHT AUSSCHLIESSLICH PROTEINE ODER PEPTIDE SIND

(57) Abstract: The invention relates to a method that makes it possible to use the highly effective technology of vaccination with deoxyribonucleic acid (DNA) not only on sequence epitopes of proteins or peptides, but also on conformation epitopes. The method also permits the use of DNA vaccination for antigens that are not or are only partially proteins or peptides. The preferred inventive vaccine contains a desoxyribonucleic acid (DNA) as its principal component. This desoxyribonucleic acid codes for a peptide sequence which represents the immunological imitation (mimicry) of a conformation-dependent antigen including protein conformation epitopes or of an antigen that is not or is only partially a protein or peptide. The mimicry peptide, which is also or can also be part of the inventive vaccine, is either an antiidiotypic antibody, an antibody fragment, a peptide derived therefrom or a specifically binding peptide obtained by selection from a peptide gene bank. The invention can be used in medical and veterinary medical immunology, including in the adjuvant therapy of tumor diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren, das es erlaubt, die hocheffektive Technologie der Vakzinierung mittels Desoxyribonukleinsäure (DNA) nicht nur auf Sequenzepitope von Proteinen oder Peptiden, sondern auch auf Konformationsepitope anzuwenden. Dieses Verfahren ermöglicht darüber hinaus die Nutzung der DNA-Vakzinierung auch bei solchen Antigenen, die keine oder nur teilweise Proteine oder Peptide sind. Die bevorzugte erfindungsgemässe Vakzine enthält als wesentlichen Bestandteil eine Desoxyribonukleinsäure (DNA), die eine Peptidsequenz kodiert, welche ihrerseits die immunologische Imitation (Mimikry) eines konformationsabhängigen Antigens einschließlich Protein-Konformationsepitope oder eines Antigens, das kein oder nur teilweise Protein oder Peptid ist, darstellt. Das Mimikry-Peptid, das ebenfalls Teil der erfindungsgemäßen Vakzine ist oder sein kann, ist entweder ein antiidiotypischer Antikörper, ein Antikörperfragment, ein daraus abgeleitetes Peptid oder ein durch Selektion aus einer Peptid-Genbank erhaltenes spezifisch bindendes Peptid. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische und die veterinärmedizinische Immunologie, darunter die adjuvante Therapie von Tumorerkrankungen.

WO 00/73430 A2

Vakzine gegen konformationsabhängige Antigene sowie gegen Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Vakzinen gegen konformationsabhängige Antigene sowie gegen Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sowie humane antiidiotypische Antikörperfragmente gegen das MUC1-Konformationsepitop und Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das MUC1-Konformationsepitop sowie antiidiotypische Antikörperfragmente gegen das TF-Antigen und Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das TF-Kohlenhydratepitop.

Zielstrukturen von Vakzinen gegen Erreger infektiöser Erkrankungen und nicht infektiöser Erkrankungen, einschließlich Tumoren, können Proteine bzw. Peptide, Kohlenhydrate oder Lipide, sowie Kombinationen aus diesen sein. Bei Proteinen bzw. Peptiden kann die immunogene Determinante (Epitop) entweder durch die Sequenz der Aminosäuren eines Abschnitts des Moleküls (Sequenzepitop) oder durch eine bestimmte räumliche Anordnung von Bindungskräften, die nicht der linearen Anordnung der Aminosäuren entspricht, bestimmt sein (Konformationsepitop). Konformationsepitope sind häufiger als Sequenzepitope; Mischformen kommen ebenfalls vor.

Konformationsepitope und Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, sind nur schwer in eine wirksame und praktikable Vakzine umzusetzen. Konformationsepitope bilden sich in der Regel nur im nativen Protein und nicht in kürzeren Peptiden aus. Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, wie beispielsweise Glykostrukturen oder Lipide, sind wenig immunogen. Ihre Synthese ist oft aufwendig. Ein besonders schwerwiegender Umstand ist, daß diese Antigene dem Immunsystem in vielen Fällen nicht richtig präsentiert werden. Eine effektive Antigenpräsentation ist aber unter anderem eine Voraussetzung für die Entstehung zytotoxischer T-Lymphozyten, d.h. für eine wirksame zelluläre Abwehr. Schließlich ist die sehr wirksame Form der DNA-Vakzinierung auf diese Antigene nicht anwendbar.

Bei der DNA-Vakzinierung (genomischen Vakzinierung) wird anstelle eines Protein- oder Peptidantigens die kodierende DNA-Sequenz als solche oder in einen Vektor verpackt intramuskulär oder intradermal als Vakzine injiziert. Auf diese Weise kann eine effektive humorale Antwort und zelluläre Antwort erreicht werden (Wolff, J.A. et al., Science 247:1465, 1990; Ulmer, J.B. et al., Vaccine 12:1541, 1994; Raz, E. et al., Cancer Res.

52:1954, 1992). Ein besonders erfolgreiches Verfahren ist das sog. "Prime-Boost-Protocol" (Keystone Symposia: DNA-Vaccines, 12.-17.4.99, Snowbird, Utah, USA, Konferenzband), bei dem die intradermale, intramuskuläre oder intrarektale Injektion einer DNA (Priming), von einer Boosterung mit dem korrespondierenden Antigen gefolgt wird. Für die Boosterung kann auch ein entsprechendes rekombinantes Virus-Vektorpartikel (z.B. Fowlpox-, Adeno- oder Alphavirus- abgeleitete Konstrukte) erfolgreich eingesetzt werden. Das "Prime-Boost"-Verfahren führt bekannterweise zu einer starken zellulären Immunantwort mit der Aktivierung spezifischer zytotoxischer T Zellen, die im Falle von Tumorstoffen besonders erwünscht ist. Deutlich verstärkt werden kann die Immunantwort durch zusätzliche Gabe von geeigneten Cytokinen, ebenfalls in Form einer DNA, von immunstimulatorischen CpG-DNA-Motiven (nichtmethylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotide) oder von geeigneten Adjuvantien (z.B. Aluminiumphosphaten).

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, die oben genannten Nachteile zu umgehen und eine Vakzine, insbesondere eine DNA-Vakzine, auch für die Fälle zu entwickeln, die einer entsprechenden Vakzinierung bisher nicht zugänglich sind.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Sie betrifft zum einen ein Verfahren, mit dem der Anwendungsbereich der Vakzinierung, insbesondere der DNA-Vakzinierung auf konformationsabhängige Antigene und Mischformen, diese fallen im Sinne der Erfindung ebenfalls unter den Begriff der Konformationsepitope, sowie Antigene, deren relevante Epitope keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, z.B. Kohlenhydrate, kombinierte Kohlenhydrat-Peptidepitope, Lipide, Glykolipide, erweitert wird und somit die oben aufgeführten Nachteile umgangen werden können. Dies geschieht erfindungsgemäß auf dem Umweg über ein das ursprüngliche Epitop (die Antigen-Determinante) immunologisch abbildendes, aber in seiner Aminosäuresequenz verschiedenes Peptid (Mimikry-Peptid). Dabei wird das Mimikry-Peptid vorzugsweise mit Hilfe der an sich bekannten Methoden des Phagen-Displays oder Ribosomen-Displays (Scott, J.K. und Smith, G.P. Science, 249:386, 1990; Winter, G. et al, Annu Rev Immunol, 12:433, 1994; Hanes, J. et al, Proc Natl Acad Sci USA, 95:14130, 1998) gewonnen, und zwar entweder als kürzeres Peptid aus Peptid-Genbanken oder in Form eines antiidiotypischen Antikörperfragments aus entsprechenden Genbanken. Als dritte, allerdings aufwendigere Methode kommt die Gewinnung antiidiotypischer Antikörper mittels der Hybridomtechnik in Frage. Das gemeinsame Ziel der drei genannten methodischen Varianten ist, das ursprüngliche Konformationsepitop oder das Epitop, das kein oder nicht ausschließlich ein Protein oder Peptid ist, in ein immunologisch entsprechendes Sequenzepitop "umzuschreiben", das eine bessere immunologische Präsentation ermöglicht und für eine DNA-Vakzinierung geeignet ist. Erfindungsgemäß

können die Vakzinen, insbesondere die DNA-Vakzinen nicht nur in Form des beschriebenen Beispiels (Prime-Boost-Protokoll), sondern, auch in vergleichbaren Varianten und in Form der DNA-Vakzine allein oder der Mimikry-Strukturen allein in entsprechend geeigneten Formulierungen eingesetzt werden.

Außerdem betrifft die Erfindung Vakzinen gegen konformationsabhängige Antigene gemäß Anspruch 1. In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden dabei die relevanten Konformationsepitope mit Hilfe der Phagen-Display- oder Ribosomen-Display-Methode in ein immunologisch entsprechendes und das Konformationsepitop imitierendes Sequenzepitop "umgeschrieben". Als primäre Reagenzien dienen dabei Moleküle, die das Zielantigen in seiner gewünschten Konformation spezifisch binden, z.B. Antikörper, Antikörperfragmente oder Rezeptoren. Aus den verschiedenen Genbibliotheken werden so Antikörperfragmente (antiidiotypische Antikörperfragmente, Ab2) oder lineare oder zirkuläre Peptide gewonnen, die die primären Reagenzien spezifisch binden und das Antigen immunologisch imitieren. Alternativ werden antiidiotypische Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnik gewonnen und gegebenenfalls Fragmente daraus isoliert. Diese Mimikry-Peptide werden in eine DNA umgeschrieben und als DNA-Vakzine eingesetzt. Ein Verfahren ist dabei das sog. "Prime-Boost-Protocol", bei dem die intradermale, intramuskuläre oder intrarektale Injektion einer DNA (Priming), in Form einer Plasmid-DNA, linearen DNA oder eines Plasmid-Replikon-Vektors, von einer Boosterung mit dem korrespondierenden Antigen, alleine, in Form einer chemischen Kopplung an Proteine, in Form von Bakteriophagen als Fusionsproteine mit Phagenhüllproteinen auf deren Oberfläche, in Form eines Fusionsproteins auf der Oberfläche anderer Viren oder attenuierter biologischer Träger oder in Form mit dem Peptid beladener dendritischer Zellen, gefolgt wird. In diesem Fall werden sowohl die DNA als auch das exprimierte Mimikry-Peptid benötigt, was bei Anwendung der Phagen-Display- bzw. Ribosomen-Display-Technik problemlos möglich ist. Alternativ kann für die Boosterung ein entsprechendes rekombinantes Virus-Vektorpartikel (z.B. Fowlpox-, Adeno- oder Alphavirus- abgeleitete Konstrukte) erfolgreich eingesetzt werden. Die Immunantwort kann deutlich durch die zusätzliche Gabe von geeigneten Cytokinen, ebenfalls in Form einer DNA, von immunstimulatorischen CpG-DNA-Motiven (nichtmethylierte Cytosin-Guanin-Dinukleotide) oder von geeigneten Adjuvantien (z.B. Aluminiumphosphaten) verstärkt werden.

Die Erfindung betrifft neben Vakzinen gegen konformationsabhängige Antigene auch Vakzinen gegen Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, gemäß Anspruch 3. Ein Zielantigentyp der Gruppe Antigene die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, sind Glykostrukturen, weitere, immunogene

Strukturen sind kombinierte Kohlenhydrat-Proteinepitope, Lipide, Glykolipide oder synthetische Strukturen.

Aus DE 196 27 352 A1 ist ein Verfahren bekannt, mit dem ein monoklonaler antiidiotypischer Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnik gewonnen wird, der reine Kohlenhydratstrukturen immunologisch imitiert. Erfindungsgemäß wird ausgehend von diesem antiidiotypischen Antikörper eine Vakzine, bevorzugt eine DNA-Vakzine dieses Antikörpers oder eines geeigneten Fragmentes davon für die Vakzinierung verwendet. So erweitert die vorliegende Erfindung dieses Verfahren aus DE196 27 352 A1 in mehreren Punkten. Es können antiidiotypische Antikörperfragmente direkt aus Antikörper-Genbibliotheken mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik gewonnen werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens können direkt auch humane Antikörperfragmente gewonnen werden. Darüber hinaus können auch kombinierte Kohlenhydrat-Peptidepitope angewendet werden. Hinzu kommt weiter ein Verfahren, mit dem kurze lineare oder zirkuläre Peptide, die das Antigen immunologisch imitieren (sogenannte Mimikry-Peptide), aus Peptid-Genbibliotheken, ebenfalls mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik, gewonnen werden können. Dabei dienen nicht nur spezifische idiotypische Antikörper (Ab1), sondern auch andere Substanzen, die die Glykostruktur spezifisch erkennen, wie z.B. Lektine oder Rezeptoren, als primäre Reagenzien zur Selektion dieser imitierenden Strukturen. Das Verfahren schließt weiterhin die Verwendung dieser gewonnenen Strukturen bevorzugt als DNA-Vakzine ein, allein oder in Kombination mit den das Antigen immunologisch imitierenden Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Peptiden in einer geeigneten Formulierung (siehe oben und Ansprüche), beispielsweise in der Formulierung des Prime-Boost-Protokolls. Außerdem können gemäß der Erfindung die imitierenden Proteinstrukturen auch alleine zur Vakzinierung verwendet werden.

Die Erfindung betrifft auch Vakzine, im vollen Umfang wie für konformationsabhängige Antigene beschrieben, gegen die Antigene Glykopeptide, Glykolipide, Lipide, synthetische Strukturen oder weitere Antigene, die keine oder lediglich teilweise Proteine oder Peptide sind, wobei die relevanten Epitope verbesserte immunogene Strukturen aufweisen, Verfahren ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Der Ansatz einer Immuntherapie bei Tumorerkrankungen geht davon aus, daß es möglich ist, die natürliche Immunantwort zu verstärken oder zu aktivieren. Die Rationale einer Vakzinierung besteht in der Bekämpfung der Residualerkrankung (Metastasenprophylaxe) nach einer konventionellen Therapie (z.B. chirurgischer Entfernung der Hauptmenge der Tumorzellen). Mimikry-Peptide imitieren definitionsgemäß immunologisch das ursprüngliche Antigen bzw. Epitop. Sie tun dies weitestgehend, aber nicht hundertprozentig.

Dies ist für den Anwendungsfall im Rahmen einer Vakzine (im besonderen bei einer Tumorstoffimpfung) eher positiv in dem Sinne zu sehen, daß spezifisch inhibierende Prozesse, z.B. Toleranzphänomene, umgangen werden.

Voraussetzung für die Entwicklung definierter Tumorstoffimpfungen ist nicht nur das Vorhandensein tumorspezifischer Antigene, sondern auch ihre Kenntnis. Auf diesem Gebiet sind in den letzten drei Jahrzehnten große Fortschritte erzielt worden, nicht zuletzt durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper.

Ein weitverbreitetes Karzinomantigen ist das epitheliale Mucin, MUC1, dessen immundominantes Epitop in vielfacher Wiederholung auf dem extrazellulären Teil des Moleküls vorkommt. Dieses Epitop bildet im nativen Zustand einen Typ-I- β -Turn aus, an synthetischen Peptiden allerdings nur unter bestimmten Bedingungen, z.B., wenn das Threonin der immundominanten Region mit GalNAc α 1-0-Thr oder Gal β 1-3GalNAc α 1-0-Thr glykosyliert ist (Karsten, U., et al., Cancer Res. 58:2541-2549, 1998). Dieses Epitop wird vom Immunsystem in der Regel als typisches Konformationsepitop wahrgenommen, vgl. Beispiel 1. Erfindungsgemäß wird dieses Konformationsepitop mittels der Phagen-Display-Technik durch immunologisch identische (oder nahezu identische) Sequenzepitope imitiert, die in Form einer DNA in einem DNA-Vakzinierungsvektor Bestandteil einer Tumorstoffimpfung sind (Beispiel 1).

Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch humane antiidiotypische Antikörperfragmente gegen das MUC1-Konformationsepitop sowie alle DNA Sequenzen, die diese Fragmente kodieren, und Proteinsequenzen oder DNA- o. Proteinteilsequenzen, die von diesen abgeleitet werden können und die die entsprechenden Eigenschaften aufweisen.

Bevorzugt handelt es sich um die folgenden humanen antiidiotypischen Antikörperfragmente gegen das MUC1-Konformationsepitop mit den folgenden Sequenzen Nr. 1 bis 31.

Fragmente, die die gewünschte DNA der scFv und der Peptide enthalten, wurden mit Hilfe der PCR vermehrt und anschließend sequenziert.

(Die Bezifferung, z.B. Q33, entspricht einem bestimmten isolierten Klon; die Sequenzen der verschiedenen scFv sind gegeneinander ausgerichtet (Alignment); die komplette Sequenz eines Klones ist für jeden Klon durchgehend über die verschiedenen Blöcke zu lesen)

Nr. 1: Q33 EVQLLESQGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIQRHGTWTGY

Nr. 2: Q1.3 EVQLLESQGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINYNGDATSY

Nr.3: Q12 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTINAAGAQTGY
Nr.4: Q4 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSRIGQKGNKTTY
Nr.5: R2 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSRITQSGTYTQY
Nr.6: Q15 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINAFGQSTRY
Nr.7: R10 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINASGTLTRY
Nr.8: Q5 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSS / SDTGSATTY
Nr.9: N6 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSNISDAGCATYY
Nr.10: Q32 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIHSAGQETIY
Nr.11: R6 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYITTINGSTTSY
Nr.12: Q9.3 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYITTINGSTTSY
Nr.13: Q24 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSITTSGGDTAY
Nr.14: Q3.1 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYINASGASTSY
Nr.15: Q25 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTITSSGQOTFY
Nr.16: N2 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSQGPVTWY
Nr.17: Q3.3 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISTSGSYTTY
Nr.18: Q21 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTINGLGTPTAY
Nr.19: N4 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQTSGRDTTY
Nr.20: R3 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAITQYGGDTGY
Nr.21: Q2 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISNLGQPTHY
Nr.22: Q30 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISNLGQLTHY
Nr.23: Q16 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIDPMGQSTNY
Nr.24: R5 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAITNTGQWTTY
Nr.25: Q26 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS;YAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQSVGTYTVY
Nr.26: Q34 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIPATGQRTFY
Nr.27: Q6.1 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSI SRTGKVTDY
Nr.28: Q1.2 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIEAGGGETTY
Nr.29: R4 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRPQGHPTQY
Nr.30: N1 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIRPPGQTTQY
Nr.31: R7 EVQLLESGEGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIQENGVTTTY

Q33 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRNGEFDYWGQGT LVT VSSGGGG
Q1.3 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSSTFDYWGQGT LVT VSSGGGG
Q12 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTGTNFDYWGQGT LVT VSSGGGG
Q4 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSHDFDYWGQGT LVT VSSGGGG
R2 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSRFDYWGQGT LVT VSSGGGG
Q15 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDHSFDYWGQGT LVT VSSGGGG
R10 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAKSFYWGQGT LVT VSSGGGG

Q5 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNYYDFDYRGQGT LVTVSSGGGG
N6 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNSCGFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q32 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTL LGFDYWGQGT LVTVSSGGGG
R6 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYSDFDYRGQGT LVTVSSGGGG
Q9.3 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYSDFDYRGQGT LVTVSSGGGG
Q24 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNYADF DYRGQGT LVTVSSGGGG
Q3.1 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNTSDFDYRGQGT LVTVSSGGGG
Q25 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRARPFDYWGQGT LVTVSSGGGG
N2 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSWPF DYWGQGT LVTVSSGGGG
Q3.3 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGTTFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q21 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLFGFDYRGQGT LVTVSSGGGG
N4 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRSQRF DYWGQGT LVTVSSGGGG
R3 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNWPYFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q2 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKL PYSFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q30 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKL PYSFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q16 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGREFDYWGQGT LVTVSSGGGG
R5 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGQNF DYWGQGT LVTVSSGGGG
Q26 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRHNPF DYWGQGT LVTVSSGGGG
Q34 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTASPF DYWGQGT LVTVSSGGGG
Q6.1 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMTSFDYWGQGT LVTVSSGGGG
Q1.2 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKATTTFDYWGQGT LVTVSSGGGG
R4 ADSVKGGFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRPPPF DYWGQGT LVTVSSGGGG
N1 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTASVFDYWGQGT LVTVSSGGGG
R7 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKERLQFDYWGQGT LVTVSSGGGG

Q33 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q1.3 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDTVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q12 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q4 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R2 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q15 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R10 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q5 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
N6 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q32 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R6 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q9.3 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI

Q24 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q3.1 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q25 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
N2 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q3.3 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q21 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
N4 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R3 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q2 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q30 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q16 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R5 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q26 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q34 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q6.1 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
Q1.2 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R4 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
N1 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
R7 SGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI

Q33 YSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNSTIPRTFGQGTKVEIKR
Q1.3 YSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTSNSPATFGQGTKVEIKR
Q12 YSASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNTDPATFGQGTKVEIKR
Q4 YRASDLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQPWPDPMPRFGQGTKVEIKR
R2 YHASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQPWEPPRTFGQGTKVEIKR
Q15 YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQPWLPPRTFGQGTKVEIKR
R10 YNASMLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTLLWLPLTFGQGTKVEIKR
Q5 YDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGTASPSTFGQGTKVEIKR
N6 YNASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYTGNPATFGQGTKVEIKR
Q32 YAASWLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSGHPSTFGQGTKVEIKR
R6 YSASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTSANPYTFGQGTKVEIKR
Q9.3 YSASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNGATPNTFGQGTKVEIKR
Q24 YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSATPGTFGQGTKVEIKR
Q3.1 YSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSGSAPATFGQGTKVEIKR
Q25 YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKR
N2 YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKR
Q3.3 YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKR

Q21	YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKR
N4	YAASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQQGQTPVTFGQGTKVEIKR
R3	YYASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNSFTPYTFGQGTKVEIKR
Q2	YDASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRPPTTFGQGTKVEIKR
Q30	YDASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRPPITFGQGTKVEIKR
Q16	YDASKLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRNPGTFGQGTKVEIKR
R5	YDASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRGPGTFGQGTKVEIKR
Q26	YDASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRGPGTFGQGTKVEIKR
Q34	YSASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRQPGTFGQGTKVEIKR
Q6.1	YDASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRQPGTFGQGTKVEIKR
Q1.2	YDASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDTRPPVTFGQGTKVEIKR
R4	YDASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRRTYPPTFGQGTKVEIKR
N1	YGASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHLNYPPLTFGQGTKVEIKR
R7	YDASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFGNYPRTFGQGTKVEIKR

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin auch Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das MUC1-Konformationsepitop sowie alle DNA Sequenzen, die diese Aminosäuresequenzen kodieren, DNA und Peptid- sowie Peptidteilsequenzen, die von diesen abgeleitet werden und die die gleichen Eigenschaften aufweisen.

Insbesondere handelt es sich um die Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden mit den folgenden Sequenzen Nr. 32 bis 47.

(Die Bezifferung, z.B. S1, entspricht einem bestimmten isolierten Klon; die Sequenzen der verschiedenen Peptide sind gegeneinander ausgerichtet)

Nr.32: S1	CEYYDVPMARC
Nr.33: S12	CDYPSRLIDLC
Nr.34: Ro1	CGLACERPCGWVC
Nr.35: Ro5	CLGGCERPCMYSC
Nr.36: Ro13	CRGRCGEWCSRPC
Nr.37: Ro6	CRGRCDQRCSRPC
Nr.38: Ro12	CPARCGVPCAMGC
Nr.39: V11	CIPHRHDGC
Nr.40: V4	CQPHRYDKSLPC
Nr.41: V10	CTTRLLNEDGSC
Nr.42: U7	LHGPLWD

Nr. 43: U10	LHGPLGM
Nr. 44: U6	LHGPLWE
Nr. 45: U7a	LHGPLWDGAAGAETVES
Nr. 46: U10a	LHGPLGMGPLGPKLLKV
Nr. 47: U6a	LHGPLWEGPLGPKLLKV

Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind (z.B. Kohlenhydrat-Antigene) werden, ähnlich wie Konformationsepitope von Proteinen, vom Immunsystem als dreidimensionale Muster von Ladungen und anderen molekularen Wechselwirkungen wahrgenommen und unterliegen wie diese Einschränkungen bei der Generierung einer zellulären Immunantwort. Auch in diesen Fällen kann die erfindungsgemäße Selektion von Mimikry-Peptiden mittels der Phagen-Display-Technik zu einem "Umschreiben" des Antigens in eine Peptid-Sequenz führen, die wiederum die Anwendung der DNA-Vakzinierungstechnik ermöglicht, vgl. Beispiel 2.

Gegenstand der Erfindung sind auch Protein-Sequenzen antiidiotypischer Antikörperfragmente gegen TF sowie Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das TF-Kohlenhydratepitop sowie alle DNA Sequenzen, die diese Aminosäuresequenzen kodieren und DNA sowie Protein- bzw. Peptid- sowie -teilsequenzen, die von diesen abgeleitet werden und die die gleichen Eigenschaften aufweisen.

Insbesondere handelt es sich um die folgenden Protein-Sequenzen antiidiotypischer Antikörperfragmente gegen TF mit den Sequenzen Nr. 48 bis 71.

Nr. 48 - >H16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSMIDGSGSQTYTADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDLDFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSTDITQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ
SYSTPNTFGQGTKVEIKR

Nr. 49 - >P3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISYSGATTNYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDASFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSTDITQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ
DYGGPTTFGQGTKVEIKR

Nr. 50 - >P8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISATGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSDGFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
ASSAPATFGQGTKVEIKR

Nr. 51 - >H6

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISAQGLTTTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRSSFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
RKLLPWTFGQGTKVEIKR

Nr. 52 - >H1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSITELGRSTQYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPWPHFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
AARRPTTFGQGTKVEIKR

Nr. 53 - >H13

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSKISELGRNTSYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDITAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
SMRMPPTFGQGTKVEIKR

Nr. 54 - >K3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIQWSGESTWYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTSSFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
RRHTPTTFGQGTKVEIKR

Nr. 55 - >K3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIQWSGESTWYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTSSFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASLLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
RRHTPTTFGQGTKVEIKR

Nr. 56 - >K4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIQFSGQTRYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTLSTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQITQSPSSLSASVG

DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
GYRQPTTFGQ
GTKVEIKR

Nr. 57 - >K2

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIRPLGSATQYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNMAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
TTRPPTTFGQGTKVEIKR

Nr. 58 - >J6

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISEQGARTMYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTPAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
MNNKPNTFGQGTKVEIKR

Nr. 59 - >E3

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSQITGLGSQTRYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGETAFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRQRPSTFGQ
GTKVEIKR

Nr. 60 - >K1

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSNITQMGMTTAYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEQTFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
RRTHPQTFGQGTKVEIKR

Nr. 61 - >E5

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISQTGTRTKYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSASFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVG
DRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
VTTHPNTFGQGTKVEIKR

Nr. 62 - >K2+

EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQVKSWTRWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSALSSSELTQDPAVSVALGQT
VRITCRGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRD

SSGNHYVFGGGKLTVLG

Nr. 63 - >K4+

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARGRRKQDKSTRWGQGTLLTVTVSSGEGGSGGGSGGSALSSSELTQDPAVSVAL
GQTVRITCQGSLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNS
RDSSGSSSVFGGGKLTVLG

Nr. 64 - >K4-

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARGRRKQDKSTRWGQGTLLTVTVSSGEGGSGGGSGGSALSSSELTQDPAVSVALGQTV
RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS
SGSSSVFGGGKLTVLG

Nr. 65 - >K9+

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPFHPWGQGTLLTVTVSSGGGGSGGGSGGSALSSSELIQDPAVSVALGQTVR
ITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSS
GTVFGGGKLTVLG

Nr. 66 - >K1+

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIIYHSGSPNYSPSLKSRATISVDK
SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQDMTQQTQTSWGQGTLLTVTVSSGGGGSGGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQ
RVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA
AWDDSLRNLVFGGKLTVLG

Nr. 67 - >K3+

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIIYHSGSPNYSPSLKSRATISVDK
SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQDMTQQTQTSWGQGTLLTVTVSSGEGGSGEGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQ
RVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA
AWDDSLRNLVFGGKLTVL

Nr. 68 - >ZA4

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQP
PGKGLEWIGEIIYHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDK
GGWGQGTLLTVTVSSGGGGSGGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSN
TVNWIYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAW
DDSLRSLVFGGKLTVLG

Nr. 69 - >ZA36

QVQLQESGPGTLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYH
SGSTNYPNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPSSIWGQGLTVTVSSG
GGSGGGGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPK
LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRSLVFGGGTK
LTVLG

Nr. 70 - >ZA14

QVQLQESGPGTLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYHS
GSTNYPNPSLKSRVTISVXKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPSHHAGTHTWGQGLTVT
VSSGGGGGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNVTNWWYQQLPG
TAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLRALVFG
GGTKLTVLG

Nr. 71 - >Z9

QVQLQESGAGLLKPSSETLTLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGS
TNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKGLNFGPWGQGLTVTVSSG
GGSGGGGGSGGSALQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNVGSNTNWWYQQLPGTAPK
LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLRSYVFGGGTK
LTVLG

Desweiteren handelt es sich um die Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das TF-Kohlenhydratepitop mit den folgenden Sequenzen Nr. 72 bis 96 .

(Die Bezifferung, z.B. S1, entspricht einem bestimmten isolierten Klon)

Nr. 72: T1	CLREGHFASFC
Nr. 73: T14	CGMLTPAWIKC
Nr. 74: T4	CETFSNLAFLC
Nr. 75: T7	CEGPEIPAFVC
Nr. 76: T3	CESMVEPAWVC
Nr. 77: T15	CTNDIMPPWVC
Nr. 78: T2	CDGLLLPIWAC
Nr. 79: T11	CAGEFVPVWAC
Nr. 80: T16	CDLGLKPAWLC
Nr. 81: X3	CGPMCSGSCVPQC
Nr. 82: X9	CDAGCNFFCPWRC

Nr.83: X2	CGPMCSGSCXPQC
Nr.84: Y8	VWWWQWS
Nr.85: Y1	MWRPFWL
Nr.86: Y4	PPWVXHL
Nr.87: Y9	LIPQWIV
Nr.88: W4	CTPADMSGC
Nr.89: W3	CTPADMSGC
Nr.90: W16	CPSVWMLDLGPC
Nr.91: W15	CHGGLTPLC
Nr.92: W8	CGPMMLWHW
Nr.93: W5	CTRHIHWGNAHW
Nr.94: W14	CTPADMSGW
Nr.95: A1	CFRGGPWWSLC
Nr.96: A2	CAVRTWVISEC

Die Erfindung wird durch Ausführungsbeispiele näher erläutert, soll jedoch auf diese Beispiele nicht beschränkt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Herstellung der Hybridomzelllinie A76-A/C7 und von Antikörpern

Balb/c-Mäuse wurden mit einer Suspension lebender menschlicher Mammakarzinomzellen der Zelllinie T-47D (Keydar, I., et al., Eur J Cancer, 15:659, 1979) nach Behandlung mit Neuraminidase (V.cholerae) ohne Adjuvans i.p. immunisiert. Als Fusionszelllinie diente X63-Ag8.653 (Kearney, J.F., et al., J Immunol 123:1548, 1979). Die Hybridomtechnik selbst wurde nach Standardmethoden (z.B. Peters, H.H., et al., "Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung", Berlin 1985; Friemel, H., "Immunologische Arbeitsmethoden", 4.Aufl., Jena 1991) durchgeführt. Die Spezifitätsanalyse der von den Hybridomzelllinien produzierten monoklonalen Antikörper (mAk) basierte auf Enzymimmunoassays mit natürlichen Glykoproteinen und synthetischen Peptiden und Glykopeptiden, Immunfluoreszenzanalysen mit diversen Zelllinien sowie immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebsschnitten. Für den mAk A76-A/C7 wurde das epitheliale Muzin, MUC1, als spezifisches Antigen eindeutig bestimmt. Als Isotyp wurde IgG1, k, mit einem kleinen Anteil von IgM der gleichen Spezifität mit Hilfe eines kommerziellen Isotyping Kit (Pharmingen, San Diego, USA) ermittelt. Ein Epitop-

Mapping im Rahmen des ISOBM TD-4 International Workshop on Monoclonal Antibodies against MUC1 (Tumor Biol. 19, Suppl.1, 1998) definierte das Epitop als APDTRPAP. Weitere Untersuchungen unter Benutzung synthetischer, glykosylierter und nicht glykosylierter Peptide zeigten, daß das Epitop des mAk A76-A/C7 in starkem Maße durch seine Konformation bestimmt wird:

- Der Antikörper bindet nur geringfügig an eine einzelne Einheit (ein Repeat), obgleich diese die Epitopsequenz enthält.
- Die Bindung an nicht glykosylierte Peptide ist von der Länge des Peptids, genau genommen von der Zahl der aneinandergereihten Repeats, abhängig (Abb. 1a). Aus der Literatur ist bekannt, daß sich die native Konformation des PDTRP-Motivs erst bei einer Peptidlänge von mehr als 3 Repeats ausbildet (Fontenot, J.D., et al., J Biomol Struct Dyn 13:245, 1995).
- Die Bindung des mAk A76-A/C7 an eine einzelne MUC1-Einheit (1 Repeat) wird stark erhöht, wenn diese im Bereich des Epitops am Thr mit GalNAc- oder Gal β 1-3GalNAc-glykosyliert ist (Abb. 1b; siehe auch Karsten, U., et al., Cancer Res, 58:2541, 1998).

Der Antikörper wurde mittels Ammoniumsulfatfällung gefolgt von einer Affinitätschromatographie an ProteinA-Sepharose gereinigt.

Gewinnung von humanen rekombinanten Antikörperfragmenten, die das konformationsabhängige Epitop des MUC1 imitieren, aus Antikörper-Genbibliotheken mit Hilfe der Phagen-Display-Technik

Es wurden zwei verschiedene synthetische Antikörper-Genbibliothek verwendet, die humane single-chain Antikörperfragmente (scFv) darstellen. Die eine Antikörper-Genbibliothek (Griffin 1 Library; <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/>) besteht aus mehr als 10^9 Phagen mit jeweils verschiedenen Kombinationen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten humaner Antikörper mit zum Teil randomisierten hypervariablen Regionen, welche mit einem Peptidstück (Linker) verbunden sind und kovalent an ein Phagenhüllprotein (pIII) gebunden sind. Sie leitet sich aus einer anderen Antikörper-Genbibliothek ab (Griffiths, A. et al., 1994, EMBO J., 13: 3245-3260). Die zweite, kleinere Genbibliothek besteht aus scFv mit dem gleichen Framework (single-framework library), die durch Bindung an Protein L und Protein A auf aktive Faltung der Antikörperfragmente vorselektioniert wurde (I.Tomlinson, 9th anniversary conference: "Antibody engineering", IBC-Conferences, San Diego 1998; I.Tomlinson, 10th anniversary conference: "Antibody engineering", IBC-Conferences, San Diego 1999; Speaker-Abstract). Die erste Bibliothek stammt aus dem Labor Dr.G.Winter und die zweite aus dem Labor Dr.I.Tomlinson (jeweils MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Die spezifischen Phagen wurden in 2-3 Runden selektioniert (Phagen-Panning) unter

Verwendung der proteolytischen Selektionsmethode mit dem Helferphagen KM13 (Kristensen, P. und Winter, G., *Folding & Design*, 3:321, 1998). Als Antigen diente der gereinigte monoklonale Antikörper A76-A/C7 (35 µg/ ml in 4 ml), das in einem Teströhrchen (Immunotube, Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4°C in PBS immobilisiert wurde. Alternativ wurde A76-A/C7 mit den Phagen inkubiert; die an die Antikörper gebundenen Phagen wurden durch Magnetbeads mit immobilisierten anti-IgG Antikörpern (Deutsche Dynal, Hamburg) gewonnen. Die in den Selektionsrunden spezifisch gebundenen Phagen (3 h bei RT) wurden nach stringenten Waschschritten (bis zu 20 mal PBS/ 0.1% Tween20 und darauffolgend 20 mal PBS) durch das in der PDTR mit GalNAc glykosylierte Tandem-Repeat (100 µg/ ml; Biosynthan, Berlin-Buch) eluiert und anschließend mit Trypsin (proteolytische Selektionsmethode) behandelt. Zwischen den Selektionsrunden wurden die eluierten Phagen in den Bakterien mit Helferphagen vermehrt und erneut selektioniert.

Gewinnung von Mimikry-Peptiden, die das konformationsabhängige Epitop des MUC1 imitieren, aus Peptid-Genbibliotheken mit Hilfe der Phagen-Display-Technik

Analog dem Beispiel zur Generierung von antiidiotypischen Antikörpern wurde in mehreren Selektionsrunden aus einer Peptid-Genbibliothek (Genbibliothek erhalten von Dr. H. Gollasch; Oligino, L., et al., *J Biol Chem* 272:29046, 1997), die 10⁷ verschiedene kurze Peptide an das Phagenhüllprotein pIII gekoppelt besitzt, spezifisch bindende Peptide gewonnen. Die exprimierten Peptide sind randomisierte Nonapeptide, die von zwei Cysteinen flankiert (CX9C) und damit zirkularisiert werden, wodurch die Stabilität und die Affinität erhöht werden. Die Selektion und Testung erfolgte wie bei der Generierung der antiidiotypischen Antikörper beschrieben. Analog dazu wurden mit weiteren Peptidbibliotheken zusätzliche lineare und zirkuläre Mimikry-Peptide gewonnen. Dabei handelt es sich um Peptid-Bibliotheken, die analog der oben beschriebenen Peptid-Bibliothek hergestellt wurden. Bei den exprimierten Peptiden handelt es sich um lineare Peptide mit 7 Aminosäuren und um zirkuläre Peptide mit 7 randomisierten Aminosäuren, flankiert von zwei Cysteinen (CX7C), um zirkuläre Peptide mit 10 randomisierten Aminosäuren, flankiert von zwei Cysteinen (CX10C), und um zirkuläre Peptide mit insgesamt 9 randomisierten Aminosäuren, mit zwei internen und zwei flankierenden Cysteinen (CX3CX3CX3C).

Spezifitätstests der Mimikry-Peptide und der antiidiotypischen Antikörperfragmente

Die selektionierten Peptide und Antikörperfragmente wurden in ELISA-Tests auf ihre Bindung an den mAk A76-A/C7 sowie in Form einer Negativ-Kontrolle an andere IgG und IgM-mAk getestet. Außerdem wurden sie in ELISA-Tests auf ihre Bindung an eine Reihe von gut charakterisierten MUC1-spezifischen Antikörpern geprüft, die sich in ihrer

Feinspezifität unterscheiden. Für die ELISA-Tests wurde die an Phagen gekoppelte Form der Peptide und Antikörperfragmente verwendet. Die antiidiotypischen svFv und die Mimikry-Peptide lassen sich dabei in Gruppen unterteilen, die:

- ausschließlich an A76-A/C7 binden
- an A76-A/C7 und an andere MUC1-spezifische Antikörper binden, die entweder nur an das Konformationsepitop (in der PDTR-Region glykosyliertes MUC1-Tandem-Repeat) binden (Typ A) oder deren Bindung durch die PDTR-Glykosylierung des MUC1 Tandem Repeats (Konformationsinduktion) stark erhöht wird (Typ B)
- an MUC1-spezifische Antikörper, die neben Typ A und B auch MUC1-spezifische Antikörper binden, die in gleichem Maße glykosylierte und unglykosylierte MUC1-Tandem-Repeats binden (Typ D)
- eine starke Bindung an MUC1-spezifische Antikörper haben, die sich bezüglich der Glykosylierung der PDTR-Region des MUC1-Repeats zu A76-A/C7 umgekehrt verhalten und das glykosylierte MUC1-Peptid nicht oder wesentlich geringer als das nichtglykosylierte MUC1-Peptid binden (Typ C). Dabei können diese Mimikry-Peptide oder antiidiotypischen scFv auch an andere Typen der MUC1-spezifischen Antikörper binden.

Die Mimikry-Peptide und antiidiotypischen Antikörperfragmente wurden außerdem in ELISA-Inhibitionstests daraufhin untersucht, ob sie, in Form der synthetisierten Peptide oder gereinigten scFv (allein oder an Phagen gekoppelt) die Bindung des A76-A/C7 an das glykosylierte MUC1-Peptid (im Epitop PDTR mit GalNAc glykosyliertes Tandem-Repeat) und nichtglykosylierte Oligomere des 20-mer Tandem-Repeats spezifisch und konzentrationsabhängig hemmen. Diese Versuche wurden mit Streptavidin-beschichteten Mikrotestplatten (BioTeZ, Berlin-Buch) und biotinylierten MUC1-Peptiden (Biosynthan, Berlin-Buch; Abb. 1c) sowie mit normalen ELISA-Testplatten, auf denen die MUC1-Peptide durch Antrocknen immobilisiert wurden, durchgeführt.

Inzuchtmäuse des Stammes Balb/c wurden intraperitoneal mit Mimikry-Peptiden und antiidiotypischen Antikörperfragmenten in Form der synthetisierten Peptide oder gereinigten scFv alleine, jeweils gekoppelt an das Protein KLH oder gekoppelt an Bakteriophagen in PBS, gemischt mit inkomplettem Freundschem Adjuvans, immunisiert. Dabei wurden Mischungen von antiidiotypischen scFv-Phagen beziehungsweise Mimikry-Peptid-Phagen aus jeweils den verschiedenen Gruppen (s.o.) verwendet. Drei Wochen später wurde mit dem gleichen Ansatz jedoch ohne Adjuvans geboostert. Die Boosterung wurde nach 3 Wochen wiederholt und 10 Tage später den Mäusen Blut entnommen. Das Serum wurde in ELISA-Tests auf Antikörper getestet, die spezifisch das konformationsabhängige Epitop des MUC1 erkennen (Versuchsaufbau wie oben). Die

Mischungen der antiidiotypischen scFv sowie der Mimikry-Peptide erzeugen eine starke Reaktion gegen das konformationsabhängige Epitop des MUC1.

Konstruktion der DNA-Vakzine und Testung an der Maus

Die antiidiotypischen scFv wurden direktional in einen DNA-Vakzinierungsvektor kloniert. Dabei wurden die scFv durch SfiI und NotI aus dem Phagemid Vektor ausgeschnitten und direktional in verschiedene DNA-Vakzinierungsvektoren kloniert die zuvor mit den gleichen Enzymen gespalten wurden. Ein geeigneter Vektor hierbei ist der Vektor pVAC2 (I.Harmer et al., Keystone Symposium „DNA-Vaccines“, Snowbird, USA, 1999; Poster und Posterabstract), der, nach erfolgter Einfügung des scFv in den DNA-Vakzinierungsvektor, ein Fusionsprotein aus dem antiidiotypischen scFv mit einem Tetanus-Toxoid kodiert. Das Tetanustoxoid hat dabei die Eigenschaft eines Adjuvans und verstärkt die Immunreaktion gegen den fusionierten Proteinanteil C.King et al., 1998, Nat.Medicine 4:1281-86).

Die Mimikry-Peptide wurden ebenfalls in verschiedene DNA-Vakzinevektoren kloniert. Die Klonierung erfolgte nach der an sich bekannten Methode der PCR-Klonierung, bei der mit Hilfe synthetischer Primer die Sequenzen die für die Mimikry-Peptide kodieren, in die DNA-Vakzinierungsvektoren eingefügt wurden. Dabei wurden ebenfalls DNA-Vakzinierungsvektoren auf der Basis des pVAC2 hergestellt, die jeweils für ein Fusionsprotein des Mimikry-Peptides mit dem Tetanustoxoid kodieren.

Die DNA der Vakzinierungsvektoren wurde nach an sich bekannten Methoden vermehrt, gereinigt und anschließend Mäusen injiziert. Dabei wurden für die Immunisierung Mischungen von DNA-Vakzinierungsvektoren, die antiidiotypische scFv beziehungsweise Mimikry-Peptide als Fusionsprotein mit dem Tetanustoxoid kodieren, die jeweils aus den verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Bindungsmustern für MUC1-spezifische Antikörper (s.o.) stammen, verwendet. Als Dosis wurden 50 µg bzw. 200 µg an Gesamt-DNA verwendet und intra muskulär appliziert. Vier Wochen später wurde mit dem gleichen Ansatz geboostert und die Boosterung nach 4 Wochen wiederholt und 10 Tage später den Mäusen Blut entnommen. Das Serum wurde in ELISA-Tests auf Antikörper getestet, die spezifisch das konformationsabhängige Epitop des MUC1 erkennen (Versuchsaufbau wie oben).

Die Immunisierung mit den Mischungen der DNA-Vakzinevektoren, ergab sowohl bei den antiidiotypischen scFv als auch bei den Mimikry-Peptiden die kodierenden DNA-Vektoren eine starke humorale Immunreaktion gegen das konformationsabhängige Epitop des MUC1 sowie eine starke Reaktion gegen das Tetanustoxoid.

Vakzine im Tumor-Challenge Modell

Im Maus Tumor-Challenge Modell wurden verschiedene Maustumorzelllinien (3T3 und P815) verwendet, die mit der cDNA der Transmembran-Form des humanen MUC1 stabil transfiziert. Die MUC1-positiven Mauszelllinien exprimieren das Konformationsepitop des MUC1, das durch Immunbindungsstudien mit dem A76-A/C7 getestet wurde. Für die Studien wurden mehrere Mäusestämme verwendet (Balb/c, DBA/2 und C57BL/6). Nach der Vakzinierung der Mäuse nach dem unten beschriebenen Prime-Boost-Protokoll wurden die Mäuse mit 10^6 bis 10^7 Tumorzellen in 200 μ l PBS subkutan in der Nähe des Peritoneum injiziert und das Tumorstadium (Tumorstadium in mm) über 20-30 Tage gemessen.

Vakzinierungsschema Prime-Boost:

Es wurden für die Immunisierungen (Priming) eine Kombination aus DNA-Vakzinierungsvektoren (kodierend für scFv-Tetanustoxoid- bzw. Mimikry-Peptid-Tetanustoxoid-Fusionsprotein) mit jeweils zwei Kandidaten aus den 4 unterschiedlichen Gruppen der antiidiotypischen-scFv bzw. Mimikry-Peptide verwendet. Für die Boosterung wurden die gleichen Kombinationen der antiidiotypischen scFv bzw. Mimikry-Peptide jedoch in ihrer Proteinform in inkomplettem Freundem Adjuvans verwendet. Hierfür wurden die scFv nach an sich bekannten Verfahren durch eine Nickel-Chelat-Chromatographie gereinigt und die Mimikry-Peptide nach an sich bekannten Verfahren chemisch an KLH gekoppelt. Für die Immunisierung wurden 50-200 μ g gesamt-DNA intramuskulär appliziert und für die scFv und Mimikry-Peptide 10-200 μ g intraperitoneal. Die zeitlichen Abstände waren 3 Wochen und die Boosterungen erfolgten 2-3 mal.

Als Kontrolle wurden die DNA-Vakzinierungsvektoren für ein scFv mit einer Spezifität gegen ein irrelevantes bakterielles Protein bzw. für ein irrelevantes Peptid (SSGSSSSGS), beziehungsweise deren gereinigte scFv oder der Peptid-KLH Komplex verwendet. Für die verschiedenen Versuchsansätze wurden jeweils 5-10 Tiere untersucht

Die Versuche zeigen, dass eine Vakzinierung nach dem Prime-Boost-Protokoll das Wachstum von injizierten MUC1-positiven Maus-Tumorzelllinien verhindert oder auf eine minimale Größe reduziert (0-20 mm² nach 20 Tagen). Die gleiche Vakzinierung erreicht bei darauffolgender Injektion mit den gleichen Tumorzellen ohne transfiziertes MUC1 eine Tumorstadium von durchschnittlich über 200 mm² (nach 20 Tagen). Auch die Injektion von MUC1-positiven Maus-Tumorzelllinien in Mäuse ohne vorherige Vakzinierung ergibt ein starkes Tumorstadium (>200 mm² nach 20 Tagen). Eine Immunisierung und Boosterung mit den Proteinen der antiidiotypischen scFv bzw. den Mimikry-Peptiden an KLH gekoppelt ohne DNA-Vakzinierungsvektoren ergibt eine Immunantwort gegen die MUC1-Tumorzellen, die Tumorstadium ist jedoch um ein vielfaches geringer als bei dem Prime-Boost Protokoll mit den DNA-Vakzinierungsvektoren.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Vakzinierung mit DNA-Vakzinierungsvektoren, die für antiidiotypische scFv bzw Mimikry-Peptide kodieren, eine ausgezeichnete Tumorstadium ergibt. Diese Reaktion ist MUC1 spezifisch. Sie ist um ein Vielfaches besser oder überhaupt

möglich im Vergleich zu Vakzinierungsstudien mit den Proteinen der antiidiotypischen scFv bzw. Mimikry-Peptiden ohne vorangegangene Immunisierung mit den entsprechenden DNA-Vakzinierungsvektoren.

Damit ist gezeigt, dass die erfindungsgemäße Vakzine gegen konformationsabhängige Antigene durch DNA-Vakzinierungsvektoren von Mimikry-Strukturen eine erfolgreiche Form der Bekämpfung von Tumoren ist, die diese konformationsabhängigen Antigene tragen.

Beispiel 2

Herstellung der Hybridomzelllinien A78-G/A7 und von Antikörpern

Balb/c-Mäuse wurden im Fall des A78-G/A7 (siehe auch Karsten, U., et al., Hybridoma 14:37, 1995), mit 100 µg Asialoglykophorin (Sigma, Deisenhofen) in PBS, gemischt mit Freundschem Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Nach 24 h wurde 100 µg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid in PBS i.p. verabreicht. Die Boosterung erfolgte nach 2 Wochen mit 100 µg Asialoglykophorin. Als Fusionszelllinie diente jeweils X63-Ag8.653 (Kearney, J.F., et al., J Immunol 123:1548, 1979). Die Hybridomtechnik wurde nach Standardmethoden (z.B. Peters, H.H., et al., "Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung", Berlin 1985; Friemel, H., "Immunologische Arbeitsmethoden", 4. Aufl., Jena 1991) durchgeführt. Die Spezifitätsanalyse der von den Hybridomzelllinien produzierten monoklonalen Antikörper basierte auf Enzymimmunoassays mit natürlichen Glykoproteinen, synthetischen Peptiden und Glykopeptiden, Glykolipiden und Neoglykolipiden und synthetischen Polyacrylamid-Kohlenhydrat-Konjugaten, Absorptionsanalysen an synthetischen Kohlenhydratkongjugaten (Synsorb, Chembiomed, Edmonton, Canada), Immunfluoreszenzanalysen mit diversen Zelllinien sowie immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebsschnitten. Für den A78-G/A7 wurde das tumorassoziierte Kohlenhydratepitop Thomsen-Friedenreich (TF), als spezifisches Antigen eindeutig bestimmt:

- A78-G/A7 bindet ausschließlich an das Disaccharid TF in der α -anomeren Konfiguration (TF α ; Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) auf natürlichen und synthetischen Strukturen, wie es natürlich nur auf Glykoproteinen in Form einer direkten O-glykosidischen Bindung an Serine oder Threonine vorkommt. TF β , das endständig an Glykanketten von Glykolipiden vorkommen kann, sowie andere Kohlenhydratstrukturen, Peptid- oder Lipidanteile werden dagegen nicht gebunden.
- A78-G/A7 bindet hochspezifisch an verschiedene Karzinomzelllinien in Immunfluoreszenzuntersuchungen und an verschiedene Karzinome in histochemischen

Untersuchungen. (Cao,Y., et al., Histochem Cell Biol 106:197, 1996; Cao,Y., et al, Cancer 76:1700, 1995; Cao,Y., et al., Virchows Arch 431:159, 1997; Karsten,U., et al., Hybridoma 14:37, 1995)

- Als Isotyp wurde für A78-G/A7 der Isotyp IgM, k, mit Hilfe eines kommerziellen Isotyping Kit (Pharmingen, San Diego, USA) ermittelt.

A78-G/A7 wurde aus Zellkulturüberständen mittels einer Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von einer Affinitätschromatographie an einer ProteinG-Affinitätsmatrix zur Abreinigung von ungewünschten IgG Antikörpern aus dem Kälberserum und schließlich mit einer Affinitätschromatographie mittels einer Ziege-anti-Maus-Ig-Affinitätsmatrix (Perzellulose, BioTeZ, Berlin-Buch) gereinigt (Dr.G.Butschak).

Herstellung von humanen rekombinanten Antikörperfragmenten gegen das Thomsen-Friedenreich Antigen aus Antikörper-Genbibliotheken mit Hilfe der Phagen-Display-Technik

Es wurden zwei verschiedene synthetische Antikörper-Genbibliotheken verwendet, die humane single-chain Antikörperfragmente (scFv) darstellen. Die eine Antikörper-Genbibliothek besteht aus mehr als 10^{10} Phagen mit jeweils verschiedenen Kombinationen der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten humaner Antikörper mit zum Teil randomisierten hypervariablen Regionen, welche mit einem Peptidstück (Linker) verbunden sind und kovalent an ein Phagenhüllprotein (pIII) gebunden sind. Sie leitet sich aus einer anderen Antikörper-Genbibliothek ab (Griffiths,A. et al., 1994, EMBO J., 13: 3245-3260). Die zweite, kleinere Genbibliothek besteht aus scFv, die auf aktive Faltung der Antikörperfragmente vorselektioniert wurden. Die erste Bibliothek stammt aus dem Labor Dr.G.Winter und die zweite aus dem Labor Dr.I.Tomlinson (jeweils MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Die spezifischen Phagen wurden in 2-3 Runden selektioniert (Phagen-Panning) unter Verwendung der proteolytischen Selektionsmethode mit dem Helferphagen KM13 (Kristensen,P. und Winter,G., Folding & Design, 3:321, 1998). Als Antigen diente der gereinigte A78-G/A7 (35 µg/ ml in 4 ml), das in einem Teströhrchen (Immunotube, Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4°C in PBS immobilisiert wurde. Alternativ wurde der gereinigte Antikörper mit den Phagen inkubiert; die an den Antikörper gebundenen Phagen durch Magnetbeads mit immobilisierten anti-IgM Antikörpern (Deutsche Dynal, Hamburg) gewonnen. Die in den Selektionsrunden spezifisch gebundenen Phagen (3 h bei RT) wurden nach stringenten Waschschritten (bis zu 20 mal PBS/ 0.1% Tween20 und darauffolgend 20 mal PBS) durch das das TFα-tragende Glykoprotein Asialoglykophorin (100-165 µg/ ml) spezifisch eluiert und teilweise anschließend mit Trypsin (proteolytische Selektionsmethode) behandelt. Zwischen den Selektionsrunden wurden die eluierten Phagen in den Bakterien mit Helferphagen vermehrt und erneut selektioniert. Es wurden 2 bis 3 Selektionsrunden durchgeführt.

Identifizierung von Peptiden mit Hilfe einer Peptid-Genbibliothek, die spezifisch das Thomsen-Friedenreich Antigen imitieren

Analog dem Beispiel zur Generierung von antiidiotypischen Antikörpern wurde in mehreren Selektionsrunden aus einer Peptid-Genbibliothek (Oligino, L., et al., J Biol Chem 272:29046, 1997), die 10^7 verschiedene kurze Peptide an das Phagenhüllprotein pIII gekoppelt besitzt, spezifisch bindende Peptide gewonnen (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Gollasch, Robert-Rössle-Klinik, Berlin-Buch). Die exprimierten Peptide sind randomisierte Nonapeptide, die von zwei Cysteinen flankiert und damit zirkularisiert werden, wodurch die Stabilität und die Affinität erhöht wird. Die Selektion und Testung erfolgte wie in der Generierung der antiidiotypischen Antikörper beschrieben.

Spezifitätstests der Mimikry-Peptide und antiidiotypischen Antikörperfragmenten

Die selektionierten Peptide und Antikörperfragmente wurden in ELISA-Tests auf ihre Bindung an TF-spezifische Antikörper und an das Pflanzenlektin PNA (Peanut Agglutinin, Arachis hypogaea Lektin; Sigma), das auch, wenn auch nicht ausschließlich, das Thomsen-Friedenreich-Antigen bindet, sowie zur Kontrolle an andere IgM und IgG-Antikörper getestet. Hierfür wurden die an Phagen gekoppelte Form der Peptide und Antikörperfragmente verwendet, die zuvor durch eine in 96-Well Platten durchgeführte Polyethylenglykol-Fällung gereinigt wurden. Die potentiellen Mimikry-Peptide und antiidiotypischen Antikörperfragmente wurden in ELISA-Inhibitionstests daraufhin untersucht, ob sie die Bindung des A78-G/A7 und/oder andere TF-erkennender Antikörper und Lektine an das Disaccharid TF α spezifisch hemmen. Dabei wurde das TF α tragende Glykoprotein Asialoglykophorin auf ELISA-Platten durch Antrocknen immobilisiert, und die Bindung der monoklonalen Antikörper und Lektine durch die Mimikry-Peptide oder antiidiotypischen Antikörperfragmente in Form der synthetisierten Peptide oder gereinigten scFv alleine oder gekoppelt an Phagen konzentrationsabhängig inhibiert (Abb. 2).

Inzuchtmäuse des Stammes Balb/c und des Stammes NMRI wurden intraperitoneal mit Mimikry-Peptiden und antiidiotypischen Antikörperfragmenten in Form der synthetisierten Peptide oder gereinigten scFv alleine, jeweils gekoppelt an das Protein KLH oder gekoppelt an Bakteriophagen in PBS, gemischt mit komplettem Freundschem Adjuvans, immunisiert. Drei Wochen später wurde mit dem gleichen Ansatz jedoch ohne Adjuvans geboostert. Die Boosterung wurde nach 3 Wochen wiederholt und 10 Tage später den Mäusen Blut entnommen. Das Serum wurde in ELISA-Tests auf Antikörperbindungen gegen das Thomsen-Friedenreich-Antigen untersucht.

Vakzinierung mit TF-imitierenden Peptiden im Maus-Tumormodell

Zellkultur: Die Maus-Colon-Karzinom-Zelllinie C-26 wurde im Medium RPMI 1640 mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum gehalten.

Tumormodell: In Mäuse des Stammes Balb/c wurden 10^5 Zellen der syngenesischen Colon-Karzinom-Zelllinie C-26 s.c. transplantiert, und zwar in zwei Varianten: a) unbehandelt und b) mit Neuraminidase aus *V.cholerae* (Serva, Heidelberg) vorbehandelt (TF-positiv). In wöchentlichen Intervallen wurde die Tumorgroße extern ermittelt. Nach 3 Wochen wurden die Tiere getötet und jeweils die Leber herauspräpariert, um die Zahl der an der Oberfläche der Leber sichtbaren Metastasen zu ermitteln.

Vakzinierung: Die Vakzinierung der Mäuse wurde 6 Wochen vor der Tumortransplantation begonnen. Die Phagenpräparation bzw. die gereinigten scFv (sowie entsprechende Kontrollen) wurden mit inkomplettem Freund-Adjuvans 1:1 emulgiert und i.p. injiziert. Vier Wochen später wurde geboostert (ohne Adjuvans). Nach weiteren 2 Wochen wurde die Tumortransplantation (Tumor-Challenge) mit unbehandelten und Neuraminidase-behandelten C-26-Zellen vorgenommen.

Ergebnis: Die vorliegenden Ergebnisse mit drei der genannten antiidiotypischen scFv zeigten, daß die Angangsrate der Tumoren bei den Neuraminidase-behandelten C-26-Zellen durch die Vakzinierung signifikant erniedrigt werden kann (auf 3- 16 % der Kontrolle; Kontrolle: 100 % Angangsrate). Darüber hinaus entsprach die Zahl der Lebermetastasen bei den vakzinierten Tieren annähernd der der Tiere, die mit unbehandelten (TF-negativen) C-26-Zellen transplantiert worden waren (rund 2 pro Leber), während die nichtvakzinierten Kontrolltiere mit TF-positiven C-26-Zellen 5-9 Metastasen pro Leber aufwiesen.

Legenden zu den Abbildungen:

Abb.1c:

Inhibition der A76-A/C7 Bindung an das MUC1-Glykopeptid (Biotin-Ahx-APPAHGVTSAPD-Thr(α -D-GalNAc)-RPAPGSTAPPAHGV TSA) durch scFv-Phagen. Das MUC1-Glykopeptid wurde an die Streptavidin-ELISA-Platte immobilisiert (5ng/Well) und anschließend mit 30% FKS in RPMI blockiert. Kulturüberstand des A76-A/C7 (1:80 verdünnt) wurde mit den durch eine Polyethylenglykolfällung gereinigten scFv-Phagen in den angegebenen Konzentrationen (Volumenprozentanteil von abgeglichenen Phagenlösungen in PBS) für eine Stunde vorinkubiert und anschließend für 2 Stunden auf die MUC1-Glykopeptidplatte gegeben. Der Nachweis erfolgte über einen anti-Maus-POD-Antikörper (Dako). Die scFv-Phagen Q6, Q7 und Q8 sind Beispiele für antiidiotypische scFv, während Q4 und Q10 Beispiele für Kontrol-scFv sind, die den A78-A/C7 zwar binden, jedoch keine antiidiotypischen scFv sind.

Abb.2:

Inhibition der A78-G/A7 Bindung an Asialoglykophorin durch scFv-Phagen. Das Asialoglykophorin (A-GP) wurde an die ELISA-Platte durch Antrocknen immobilisiert (25ng/Well) und anschließend mit 30% FKS in RPMI blockiert. Kulturüberstand des A78-G/A7 (1:20 verdünnt) wurde mit den durch eine Polyethylenglykolfällung gereinigten scFv-Phagen in den angegebenen Konzentrationen (Volumenprozentanteil von abgeglichenen Phagenlösungen in PBS) für eine Stunde vorinkubiert und anschließend für 2 Stunden auf die A-GP Platte gegeben. Der Nachweis erfolgte über einen anti-Maus-POD-Antikörper (Dako). Die scFv-Phagen P9, P13, P16, P3 und K3 sind Beispiele für antiidiotypische scFv, während P8 und Q1 Beispiele für Kontrol-scFv sind, von denen P8 zwar den A78-G/A7 bindet, jedoch kein antiidiotypischer scFv ist und Q1 ein Phage ist, der nicht den A78-G/A7 bindet.

Patentansprüche

1. Vakzine gegen konformationsabhängige Antigene, gekennzeichnet durch

- a. eine DNA, welche diejenige Region eines antiidiotypischen Antikörpers (Ab2), eines antiidiotypischen Antikörperfragmentes oder eines anderen Peptides kodiert, die die Bindungsstelle eines Antikörpers (Ab1) oder eines das Antigen bindende Molekül spezifisch bindet und das ursprüngliche Antigen immunologisch imitiert, wobei das Epitop ganz oder teilweise konformationsabhängig ist und eine immunogene Struktur aufweist, welche nicht durch eine einfache Aufeinanderfolge von Aminosäuren der Primärsequenz des Antigens sondern durch eine bestimmte räumliche Konformation von Aminosäuren definiert ist, und die DNA entweder in Form nackter DNA, linear oder zirkulär, und/oder mit Hilfe eines viralen Vektors mit oder ohne Adjuvantien angewendet wird, oder
- b. durch einen Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein Peptid, die das konformationsabhängige Antigen immunologisch imitieren, oder
- c. durch eine Kombination der Stoffe aus a und b.

2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die immunogenen Strukturen durch eine bestimmte räumliche Konformation von Aminosäuren definiert sind, die beispielsweise durch die Interaktion von Aminosäuren zustande kommen, welche in der Primärsequenz des Antigens nicht benachbart sind, oder durch Ausbildung einer Sekundär- oder höheren Strukturordnung aufgrund einer Interaktion von Aminosäuren aus Proteinen eines Proteinkomplexes oder durch die Modifikation der Primärstrukturen, beispielsweise durch Glykosylierung oder Phosphorylierung, bedingt sind.

3. Vakzine gegen Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, gekennzeichnet durch

- a. eine DNA, welche diejenige Region eines antiidiotypischen Antikörpers (Ab2), eines antiidiotypischen Antikörperfragmentes oder eines anderen Peptides kodiert, die die Bindungsstelle eines Antikörpers (Ab1) oder eines das Antigen bindende Molekül spezifisch bindet und das ursprüngliche Antigen immunologisch imitiert, wobei es sich bei dem Antigen um Substanzen handelt, deren relevanten Epitope zwar keine Protein- oder Peptidepitope sind, jedoch immunogene Strukturen aufweisen und die DNA entweder in Form nackter DNA, linear oder zirkulär, und/oder mit Hilfe eines viralen Vektors mit oder ohne Adjuvantien angewendet wird, oder

b. durch einen Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein Peptid, die das Antigen, das kein oder nicht ausschließlich ein Protein oder Peptid ist, immunologisch imitieren, oder

c. durch eine Kombination der Stoffe aus a und b.

4. Vakzine nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß immunogene Strukturen der relevanten Epitope vorzugsweise Glykostrukturen, kombinierte Kohlenhydrat-Proteinepitope, Lipide, Glykolipide oder synthetische Strukturen darstellen.

5. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide linear oder zirkulär, beispielsweise durch Einfügung von Cysteinen an geeigneten Stellen, vorliegen.

6. Verwendung einer Vakzine nach Anspruch 1 bis 5 zur Immunisierung mittels DNA und/oder den das Antigen immunologisch imitierenden Antikörpern, Antikörperfragmenten (antiidiotypische Ak) oder Peptiden (Mimikry-Peptide).

7. Verwendung der Vakzine nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch als Vakzine geeignete Formulierungen dieser Proteinstrukturen entweder durch Gabe der sie kodierenden DNA gemäß 1a oder 3a, oder durch Gabe der Strukturen alleine, wie Peptide, inverse Peptide oder retroinverse Peptide, in Form einer chemischen Kopplung an Proteine, wie Keyhole limpet hemocyanin (KLH), in Form von Bakteriophagen als Fusionsproteine mit Phagenhüllproteinen auf deren Oberfläche, in Form eines Fusionsproteins auf der Oberfläche anderer Viren oder attenuierter biologischer Träger oder durch Beladung dendritischer Zellen nach an sich bekannten Verfahren, jeweils gegebenenfalls in Kombination mit geeigneten Adjuvantien oder immunstimulatorischen Molekülen wie Cytokinen, die auch in Form einer sie kodierenden DNA verabreicht werden können.

8. Verwendung der Vakzine nach Anspruch 6 und 7, gekennzeichnet durch eine Kombination der DNA und der Protein-Strukturen in einer geeigneten Formulierung.

9. Verwendung von Vakzinen nach Anspruch 1, 2, 5, 6, 7 oder 8 gegen tumorassoziierte konformationsabhängige Antigene.

10. Verwendung von Vakzinen nach Anspruch 3 bis 8 gegen tumorassoziierte Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind.

11. Verwendung von Vakzinen nach Anspruch 1, 2, 5, 6, 7 oder 8 gegen konformationsabhängige Antigene von Erregern infektiöser Erkrankungen, wie Prionen, Viren, Bakterien, Parasiten.

12. Verwendung von Vakzinen nach Anspruch 3 bis 8 gegen Antigene von Erregern infektiöser Erkrankungen, wie Prionen, Viren, Bakterien, Parasiten, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind.

13. Verwendung von Vakzinen nach Anspruch 1 bis 8 gegen weitere infektiöse oder nichtinfektiöse Erkrankungen auf dem medizinischen und veterinärmedizinischen Gebiet.

14. Verfahren zur Herstellung einer Vakzine gegen konformationsabhängige Antigene gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1, 2 oder 5 auf der Basis immunologisch imitierender Strukturen in Form antiidiotypischer Antikörper, antiidiotypischer Antikörperfragmente oder Mimikry-Peptide oder daraus resultierender DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß man:

a. mit der Hybridomtechnik monoklonale Antikörper (Ab1) gegen konformationsabhängige Antigene nach Anspruch 1 und antiidiotypische Antikörper (Ab2 vom Typ b), die das Antigen nach Anspruch 1 oder 2 immunologisch imitieren,

b. aus genomischen, Hybrid-, semisynthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken sowie aus Genbibliotheken immunisierter oder nicht-immunisierter Spender mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik rekombinante Antikörperfragmente (Ab1) gegen konformationsabhängige Antigene oder mit Hilfe idiotypischer Antikörper oder Antikörperfragmente, die das konformationsabhängige Antigen spezifisch erkennen, rekombinante antiidiotypische Antikörperfragmente (Ab2), die das Antigen nach Anspruch 1, 2 oder 5 immunologisch imitieren,

c. aus genomischen, Hybrid-, semisynthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken sowie aus Genbibliotheken immunisierter oder nicht-immunisierter Spender mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen (z.B. Rezeptoren), die das konformationsabhängige Antigen spezifisch erkennen, rekombinante Antikörperfragmente, die das konformationsabhängige Antigen nach Anspruch 1, 2 oder 5 immunologisch imitieren,

d. aus synthetischen Peptid-Genbibliotheken mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe idiotypischer Antikörper oder Antikörperfragmente, die das konformationsabhängige Antigen spezifisch erkennen, lineare oder zirkuläre Peptide, die die antigen-bindende Regionen der konformationsspezifischen Antikörper (Ab1) nach Anspruch 1 binden und somit das Antigen nach Anspruch 1, 2 oder 5 immunologisch imitieren,

e. aus synthetischen Peptid-Genbibliotheken mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen (z.B. Rezeptoren), die das Zielantigen spezifisch erkennen, lineare oder zirkuläre Peptide, die die antigen-bindende Regionen der konformationsspezifischen Antikörper (Ab1) nach Anspruch 1 binden und somit das Antigen nach Anspruch 1, 2 oder 5 immunologisch imitieren,

herstellt bzw. selektioniert und eine den Antikörpern oder Peptiden nach a-e oder geeigneten Teilpeptiden oder abgeleiteten Peptiden, beispielsweise durch Zirkularisierung, Mutationen, in Form inverser oder retroinverser Peptide, oder repetitiven Konstrukten entsprechende DNA entsprechend des Anspruches 1 nach an sich bekannten Verfahren erzeugt.

15. Verfahren zur Herstellung von Vakzinen gegen Antigene gemäß einem der Ansprüche 3, 4 oder 5 auf der Basis immunologisch imitierender Strukturen in Form antiidiotypischer Antikörperfragmente oder Mimikry-Peptide oder daraus resultierender DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß man:

a. aus genomischen, Hybrid-, semisynthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken sowie aus Genbibliotheken immunisierter oder nicht-immunisierter Spender mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik rekombinante Antikörperfragmente (Ab1) gegen Antigene, die primär keine Proteine oder Peptide sind, oder mit Hilfe idiotypischer Antikörper oder Antikörperfragmente, die das konformationsabhängige Antigen spezifisch erkennen, rekombinante antiidiotypische Antikörperfragmente (Ab2), die das Antigen nach Anspruch 3, 4 oder 5 immunologisch imitieren,

b. aus genomischen, Hybrid-, semisynthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken sowie aus Genbibliotheken immunisierter oder nicht-immunisierter Spender mittels der Phagen-Display-Technik oder der Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen, beispielsweise von Lektinen, Rezeptoren, Peptiden, die das Zielantigen spezifisch erkennen, rekombinante Antikörperfragmente, die das Zielantigen nach Anspruch 3, 4 oder 5 immunologisch imitieren,

c. aus synthetischen Peptid-Genbibliotheken mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik lineare oder zirkuläre Peptide, die die antigen-bindende Regionen der Antikörper (Ab1) gegen Antigene, die keine oder nicht ausschließlich Proteine oder Peptide sind, nach Anspruch 3 und 4, binden und somit das Antigen nach Anspruch 3, 4 oder 5 immunologisch imitieren,

d. aus synthetischen Peptid-Genbibliotheken mittels Phagen-Display-Technik oder Ribosomen-Display-Technik mit Hilfe von Substanzen, beispielsweise Lektine, Rezeptoren, Peptide, die das Zielantigen spezifisch erkennen, lineare oder zirkuläre Peptide, die das Zielantigen nach Anspruch 3, 4 oder 5 immunologisch imitieren,

herstellt bzw. selektioniert und eine den Antikörpern oder Peptiden nach a-d oder geeigneten Teilpeptiden oder abgeleiteten Peptiden, beispielsweise durch Zirkularisierung, Mutationen, in Form inverser oder retroinverser Peptide, oder repetitiven Konstrukten entsprechende DNA entsprechend des Anspruches 3 nach an sich bekannten Verfahren erzeugt.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß man Vakzinen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 herstellt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vakzine gegen das immundominante Epitop (PDT¹) des MUC1 herstellt, dessen für die Immunogenität wichtige Konformation beispielsweise durch die Glykosylierung des Thr im Epitop PDTR herausgebildet wird.

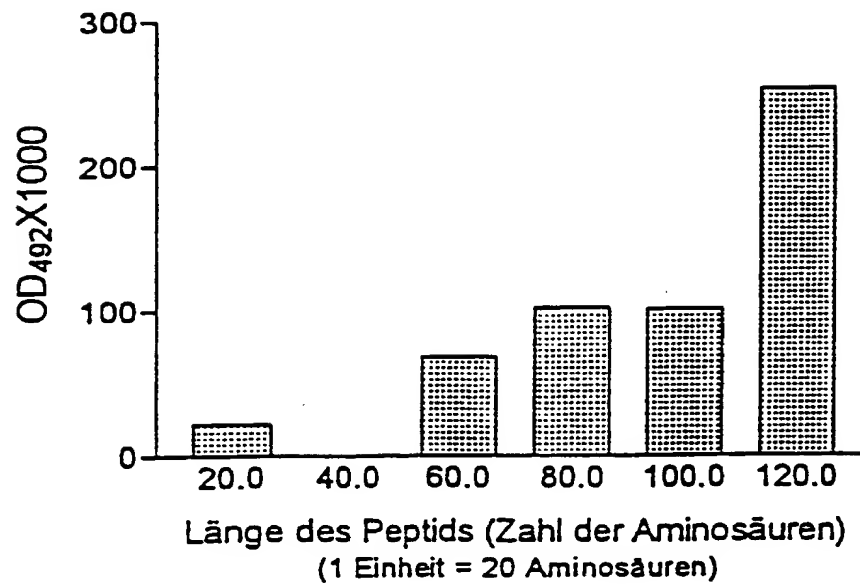
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vakzine gegen die tumorassoziierten Glykostrukturen Core-1 Struktur (GalNAc β 1-3-GalNAc α 1), Tn oder Sialyl-Tn herstellt.

19. Humane antiidiotypische Antikörperfragmente gegen das MUC1-Konformationsepitop mit den Sequenzen Nr. 1 bis 31, sowie davon abgeleitete Proteinsequenzen und -teilsequenzen, die die gleichen Eigenschaften aufweisen.

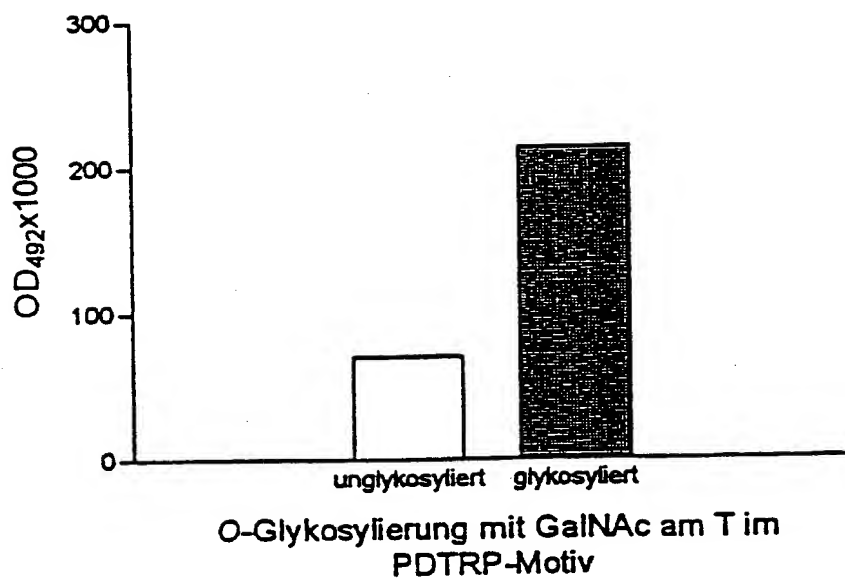
20. DNA Sequenzen, die die Fragmente und davon abgeleitete Proteine bzw. Teilsequenzen mit den gleichen Eigenschaften gemäß Anspruch 19 kodieren.

21. Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das MUC1-Konformationsepitop mit den Sequenzen Nr. 32 bis 47, sowie davon abgeleitete Peptidsequenzen und -teilsequenzen, die die gleichen Eigenschaften aufweisen.
22. DNA Sequenzen, die die Aminosäuresequenzen und davon abgeleitete Peptide bzw. Teilsequenzen mit den gleichen Eigenschaften gemäß Anspruch 21 kodieren.
23. Antiidiotypische Antikörperfragmente gegen das TF-Antigen mit den Sequenzen Nr. 48 bis 71, sowie davon abgeleitete Proteinsequenzen und -teilsequenzen, die die gleichen Eigenschaften aufweisen.
24. DNA Sequenzen, die die Fragmente und davon abgeleitete Proteine bzw. Teilsequenzen mit den gleichen Eigenschaften gemäß Anspruch 23 kodieren.
25. Aminosäuresequenzen von Mimikry-Peptiden gegen das TF-Kohlenhydratepitop mit den Sequenzen Nr. 71 bis 96, sowie davon abgeleitete Peptidsequenzen und -teilsequenzen, die die gleichen Eigenschaften aufweisen.
26. DNA Sequenzen, die die Aminosäuresequenzen und davon abgeleitete Peptide bzw. Teilsequenzen mit den gleichen Eigenschaften gemäß Anspruch 25 kodieren.

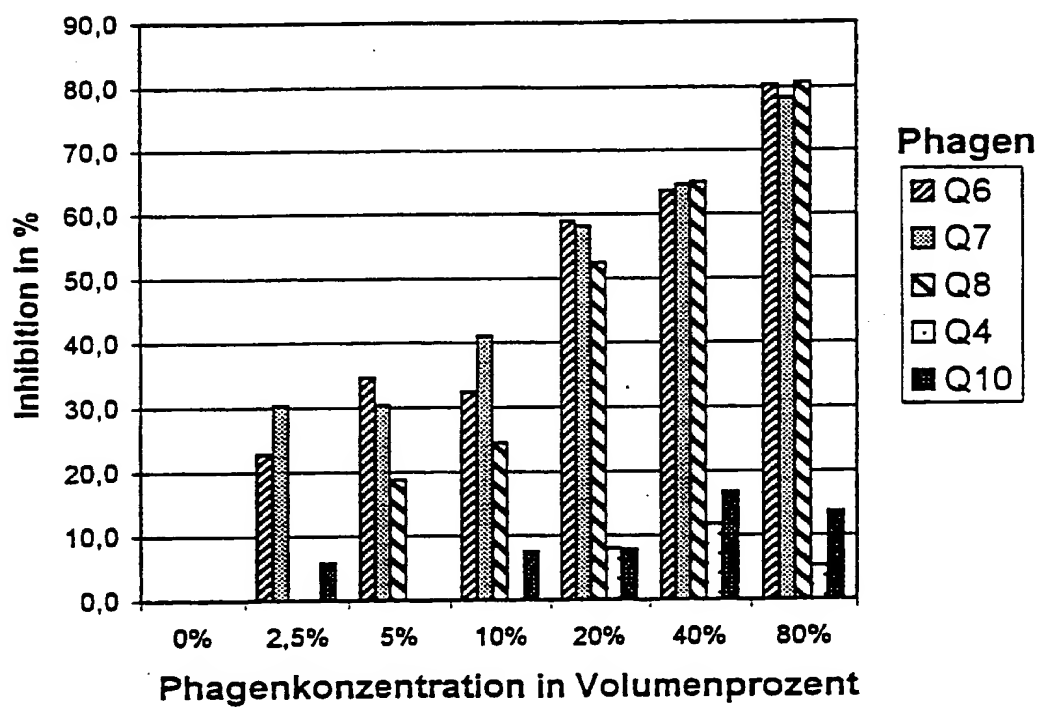
**Abb. 1a: Bindung des mAk A76-A/C7 an
synthetische MUC1-Peptide
verschiedener Länge**



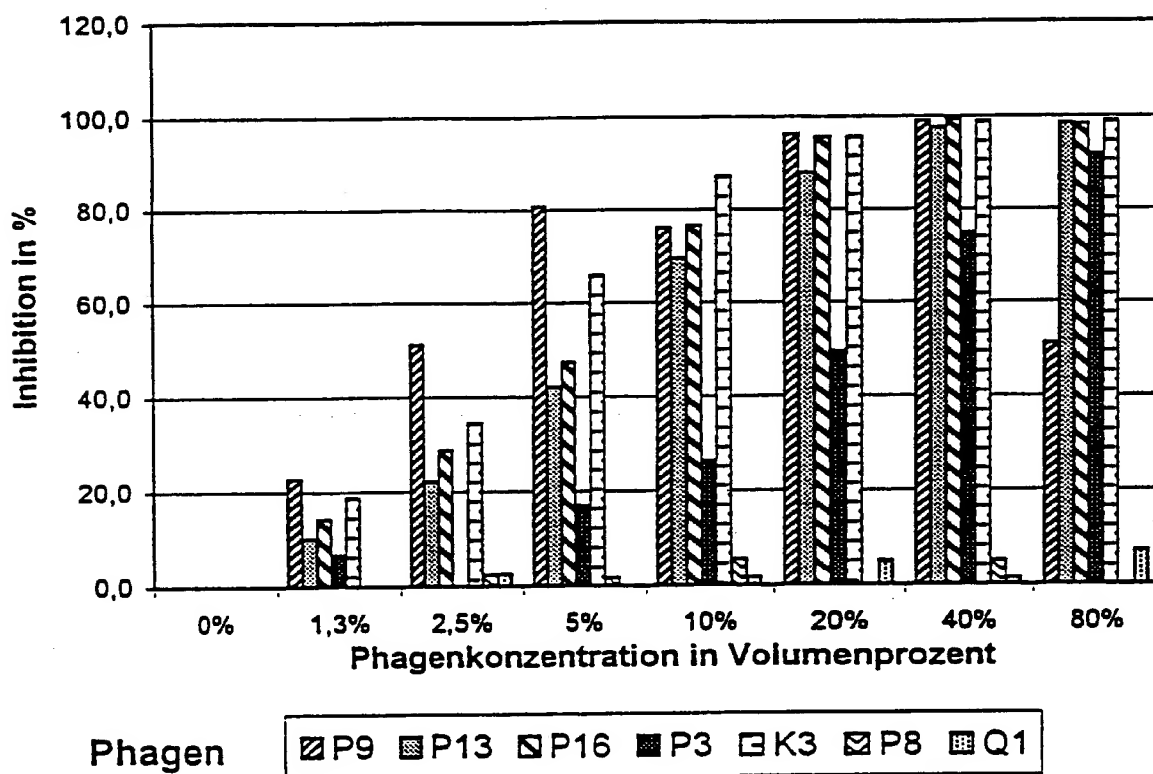
**Abb. 1b: Bindung des mAk A76-A/C7 an
das synthetische MUC1-Peptid #585
(30 Aminosäuren)**



**Abb.1c: Inhibition der A76-A/C7 Bindung an das
MUC1-Glykopeptid
durch antiidiotypische scFv-Phagen**



**Abb.2 Inhibition der A78-G/A7 Bindung an
Asialoglykophorin durch antiidiotypische
scFv-Phagen**



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/73430 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 48/00,
39/395, C07K 16/42, 14/00, 16/30, A61K 39/00, A61P
35/00, 31/00, C12N 15/13, 15/10

KARSTEN, Uwe [DE/DE]; Oderbruchstrasse 29,
D-10407 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01809

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10,
D-13125 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Mai 2000 (29.05.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
199 24 405.7 27. Mai 1999 (27.05.1999) DE
199 43 016.0 9. September 1999 (09.09.1999) DE

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-
LARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10,
D-13125 Berlin (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 29. März 2001

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GOLETZ, Stef-
fen [DE/DE]; Triftstrasse 15b, D-13129 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: VACCINES AGAINST CONFORMATION-DEPENDENT ANTIGENS AND AGAINST ANTIGENS THAT ARE
NOT OR ARE NOT ONLY PROTEINS OR PEPTIDES

(54) Bezeichnung: VAKZINE GEGEN KONFORMATIONSABHÄNGIGE ANTIGENE SOWIE GEGEN ANTIGENE, DIE
KEINE ODER NICHT AUSSCHLIESSLICH PROTEINE ODER PEPTIDE SIND

(57) Abstract: The invention relates to a method that makes it possible to use the highly effective technology of vaccination with deoxyribonucleic acid (DNA) not only on sequence epitopes of proteins or peptides, but also on conformation epitopes. The method also permits the use of DNA vaccination for antigens that are not or are only partially proteins or peptides. The preferred inventive vaccine contains a desoxyribonucleic acid (DNA) as its principal component. This desoxyribonucleic acid codes for a peptide sequence which represents the immunological imitation (mimicry) of a conformation-dependent antigen including protein conformation epitopes or of an antigen that is not or is only partially a protein or peptide. The mimicry peptide, which is also or can also be part of the inventive vaccine, is either an antiidiotypic antibody, an antibody fragment, a peptide derived therefrom or a specifically binding peptide obtained by selection from a peptide gene bank. The invention can be used in medical and veterinary medical immunology, including in the adjuvant therapy of tumor diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren, das es erlaubt, die hocheffektive Technologie der Vakzinierung mittels Desoxyribonukleinsäure (DNA) nicht nur auf Sequenzepitope von Proteinen oder Peptiden, sondern auch auf Konformationsepitope anzuwenden. Dieses Verfahren ermöglicht darüber hinaus die Nutzung der DNA-Vakzinierung auch bei solchen Antigenen, die keine oder nur teilweise Proteine oder Peptide sind. Die bevorzugte erfindungsgemässe Vakzine enthält als wesentlichen Bestandteil eine Desoxyribonukleinsäure (DNA), die eine Peptidsequenz kodiert, welche ihrerseits die immunologische Imitation (Mimikry) eines konformationsabhängigen Antigens einschließlich Protein-Konformationsepitope oder eines Antigens, das kein oder nur teilweise Protein oder Peptid ist, darstellt. Das Mimikry-Peptid, das ebenfalls Teil der erfindungsgemässen Vakzine ist oder sein kann, ist entweder ein antiidiotypischer Antikörper, ein Antikörperfragment, ein daraus abgeleitetes Peptid oder ein durch Selektion aus einer Peptid-Genbank erhaltenes spezifisch bindendes Peptid. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische und die veterinärmedizinische Immunologie, darunter die adjuvante Therapie von Tumorerkrankungen.

WO 00/73430 A3



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K48/00 A61K39/395 C07K16/42 C07K14/00 C07K16/30
 A61K39/00 A61P35/00 A61P31/00 C12N15/13 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, LIFESCIENCES, AIDSLINE, CANCERLIT, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH,
 STRAND, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 00444 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA ;KARSTEN UWE (DE)) 8 January 1998 (1998-01-08) cited in the application the whole document ---	3,4,6, 10,13, 14,16
X	EP 0 508 282 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 14 October 1992 (1992-10-14) column 1, line 10-15 column 2, line 45-50 example 2 claims 1,14 ----- -/--	3,4,6, 10,13, 14,16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 2000

Date of mailing of the international search report

24/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No.

PCT/DE 00/01809

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POTTER V ET AL: "DNA vaccination with A scFv of the anti-idiotypic antibody 105Ad7 induces a TH1 immune response." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 78, no. SUPPL. 2, 1998, page 18 XP000960534 Joint Meeting of the British Oncological Association, the Association of Cancer Physicians and the Royal College of Radiologists; Nottingham, England, UK; July 5-7, 1998 ISSN: 0007-0920 the whole document	1,2,5-9, 13
A		19-26
X	GOLLASCH H ET AL: "Identification of immunogenic peptide-mimics for the Thomsen-Friedenreich-glycoantigen." ANNALS OF HEMATOLOGY, vol. 77, no. SUPPL. 2, 1998, page S84 XP000960533 Annual Congress of the German and Austrian Societies of Hematology and Oncology; Frankfurt, Germany; October 25-28, 1998 ISSN: 0939-5555 the whole document	1-10, 13-16, 23-26
X	PINILLA CLEMENCIA ET AL: "All-D peptides recognized by an anti-carbohydrate antibody identified from a positional scanning library." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 283, no. 5, 13 November 1998 (1998-11-13), pages 1013-1025, XP002152467 ISSN: 0022-2836 page 283, right-hand column, line 2,3 page 1014, left-hand column, paragraph 3 page 1014, right-hand column, paragraph 3 page 1019, left-hand column, paragraph 2 page 1020, right-hand column, paragraph 3 page 1021, left-hand column, paragraph 2 -/--	3-8, 11-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte lional Application No

PCT/DE 00/01809

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LOSMA M J ET AL: "MIMICRY OF A CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN EPITOPE BY A RAT MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, US, NEW YORK, NY, vol. 56, no. 4, 15 February 1994 (1994-02-15), pages 580-584, XP000577759 ISSN: 0020-7136 abstract page 580, left-hand column, paragraph 2 page 580, right-hand column, paragraph 4 -page 581, left-hand column, paragraph 3</p>	1-10, 13
A	<p>APOSTOLOPOULOS V ET AL: "Carbohydrate /peptide mimics: effect on MUC1 cancer immunotherapy." JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, (1999 MAY) 77 (5) 427-36. REF: 57 , XP000960532 page 429, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 2 page 432, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 2</p>	1-26
A	<p>KARSTEN UWE ET AL: "Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation." CANCER RESEARCH, vol. 58, no. 12, 15 June 1998 (1998-06-15), pages 2541-2549, XP002112486 ISSN: 0008-5472 abstract</p>	1-26
P,X	<p>WO 99 40433 A (UNIV PENNSYLVANIA ;KIEBER EMMONS THOMAS (US)) 12 August 1999 (1999-08-12) page 7, line 20-29 page 8, line 24 -page 9, line 11 page 22, line 7 -page 24, line 3 page 25, line 11-16</p>	1-18
P,X	<p>WO 99 54457 A (POLONELLI LUCIANO ;TETI GIUSEPPE (IT); CHIRON SPA (IT)) 28 October 1999 (1999-10-28) page 2, line 12-21 page 28, line 14-21 page 31, line 12-16 page 35, line 14 -page 37, line 16</p>	1-8, 11-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. .ional Application No

PCT/DE 00/01809

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9800444 A	08-01-1998	DE 19627352 A EP 0937105 A	02-01-1998 25-08-1999
EP 0508282 A	14-10-1992	JP 4304897 A CA 2064413 A	28-10-1992 02-10-1992
WO 9940433 A	12-08-1999	AU 2657599 A	23-08-1999
WO 9954457 A	28-10-1999	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01809

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K48/00 A61K39/395 C07K16/42 C07K14/00 C07K16/30
A61K39/00 A61P35/00 A61P31/00 C12N15/13 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, LIFESCIENCES, AIDSLINE, CANCERLIT, EMBASE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, STRAND, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 00444 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA ;KARSTEN UWE (DE)) 8. Januar 1998 (1998-01-08) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	3,4,6, 10,13, 14,16
X	EP 0 508 282 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 14. Oktober 1992 (1992-10-14) Spalte 1, Zeile 10-15 Spalte 2, Zeile 45-50 Beispiel 2 Ansprüche 1,14	3,4,6, 10,13, 14,16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>POTTER V ET AL: "DNA vaccination with A scFv of the anti-idiotypic antibody 105Ad7 induces a TH1 immune response."</p> <p>BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 78, Nr. SUPPL. 2, 1998, Seite 18 XP000960534</p> <p>Joint Meeting of the British Oncological Association, the Association of Cancer Physicians and the Royal College of Radiologists; Nottingham, England, UK; July 5-7, 1998 ISSN: 0007-0920 das ganze Dokument</p>	1,2,5-9, 13
A	---	19-26
X	<p>GOLLASCH H ET AL: "Identification of immunogenic peptide-mimics for the Thomsen-Friedenreich-glycoantigen."</p> <p>ANNALS OF HEMATOLOGY, Bd. 77, Nr. SUPPL. 2, 1998, Seite S84 XP000960533</p> <p>Annual Congress of the German and Austrian Societies of Hematology and Oncology; Frankfurt, Germany; October 25-28, 1998 ISSN: 0939-5555 das ganze Dokument</p>	1-10, 13-16, 23-26
X	<p>PINILLA CLEMENCIA ET AL: "All-D peptides recognized by an anti-carbohydrate antibody identified from a positional scanning library."</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 283, Nr. 5, 13. November 1998 (1998-11-13), Seiten 1013-1025, XP002152467 ISSN: 0022-2836</p> <p>Seite 283, rechte Spalte, Zeile 2,3 Seite 1014, linke Spalte, Absatz 3 Seite 1014, rechte Spalte, Absatz 3 Seite 1019, linke Spalte, Absatz 2 Seite 1020, rechte Spalte, Absatz 3 Seite 1021, linke Spalte, Absatz 2</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	3-8, 11-16

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>LOSMA M J ET AL: "MIMICRY OF A CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN EPITOPE BY A RAT MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER,US,NEW YORK, NY, Bd. 56, Nr. 4, 15. Februar 1994 (1994-02-15), Seiten 580-584, XP000577759 ISSN: 0020-7136 Zusammenfassung Seite 580, linke Spalte, Absatz 2. Seite 580, rechte Spalte, Absatz 4 -Seite 581, linke Spalte, Absatz 3.</p>	1-10,13
A	<p>APOSTOLOPOULOS V ET AL: "Carbohydrate /peptide mimics: effect on MUC1 cancer immunotherapy." JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, (1999 MAY) 77 (5) 427-36. REF: 57 , XP000960532 Seite 429, linke Spalte, Absatz 1 -rechte Spalte, Absatz 2 Seite 432, linke Spalte, Absatz 3 -rechte Spalte, Absatz 2</p>	1-26
A	<p>KARSTEN UWE ET AL: "Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation." CANCER RESEARCH, Bd. 58, Nr. 12, 15. Juni 1998 (1998-06-15), Seiten 2541-2549, XP002112486 ISSN: 0008-5472 Zusammenfassung</p>	1-26
P,X	<p>WO 99 40433 A (UNIV PENNSYLVANIA ;KIEBER EMMONS THOMAS (US)) 12. August 1999 (1999-08-12) Seite 7, Zeile 20-29 Seite 8, Zeile 24 -Seite 9, Zeile 11 Seite 22, Zeile 7 -Seite 24, Zeile 3 Seite 25, Zeile 11-16</p>	1-18
P,X	<p>WO 99 54457 A (POLONELLI LUCIANO ;TETI GIUSEPPE (IT); CHIRON SPA (IT)) 28. Oktober 1999 (1999-10-28) Seite 2, Zeile 12-21 Seite 28, Zeile 14-21 Seite 31, Zeile 12-16 Seite 35, Zeile 14 -Seite 37, Zeile 16</p>	1-8, 11-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01809

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9800444	A	08-01-1998	DE	19627352 A	02-01-1998
			EP	0937105 A	25-08-1999
EP 0508282	A	14-10-1992	JP	4304897 A	28-10-1992
			CA	2064413 A	02-10-1992
WO 9940433	A	12-08-1999	AU	2657599 A	23-08-1999
WO 9954457	A	28-10-1999	KEINE		